

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение
высшего образования «Национальный исследовательский технологический
университет «МИСИС»

Теплякова Татьяна Олеговна

МОДИФИКАЦИЯ ПОВЕРХНОСТИ И ПОВЫШЕНИЕ
АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫХ СВОЙСТВ СВЕРХУПРУГОГО СПЛАВА
Ti-18Zr-15Nb МЕДИЦИНСКОГО НАЗНАЧЕНИЯ

Специальность 2.6.17
Материаловедение

Автореферат диссертации
на соискание ученой степени кандидата технических наук

Научный руководитель
кандидат технических наук Конопацкий Антон Сергеевич

Москва, 2023

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность работы

Приоритетной задачей современной медицины является разработка методов и подходов, направленных на улучшение поверхностных свойств существующих биоматериалов, предназначенных для замещения поврежденных участков костной ткани. Материалы для медицинского применения обладают широким спектром свойств, таких как высокая коррозионная стойкость, низкий модуль упругости, высокая прочность, низкая плотность, биомеханическая совместимость, но нуждаются в повышении своих антибактериальных характеристик. Известно, что при имплантации высок риск возникновения воспаления на границе между имплантируемым материалом и костной тканью, подавление которого при помощи лекарственных препаратов может быть затруднено. Такого рода инфекции и их дальнейшее распространение способны привести к негативным последствиям, включая необходимость удаления установленной конструкции. Постоянная замена имплантатов наносит серьезный ущерб здоровью человека, а также экономически не выгодна и вызывает большие трудности с медицинской точки зрения.

Эффективным способом предотвращения воспалений при имплантации является нанесение защитных покрытий на поверхность материала. Благородные металлы являются высокобиосовместимыми материалами из-за их исключительной химической инертности и стойкости в биологических средах, а некоторые из них обладают также и антибактериальными свойствами. Серебро уже на протяжении многих лет используется для предотвращения инфекций, в том числе в клинических условиях, а его активность подтверждена в отношении широкого спектра бактериальных микроорганизмов. Антибактериальный механизм серебра включает высвобождение ионов, поглощаемых клетками и последующий каскад внутриклеточных реакций, которые приводят к нарушению работы бактерии. Также распространенным для медицинского применения является использование золота и его сплавов. Более того, наночастицы золота многовалентны и существует возможность модифицировать их с помощью функциональных групп и лекарственных препаратов. Совместный эффект золота с антибактериальными препаратами способен обеспечить устойчивый антибактериальный эффект, при этом во много раз снизив концентрацию поступающих в организм лекарственных веществ.

При разработке антибактериального покрытия для имплантатов стоит принять во внимание особенности материала, из которого будет изготовлена металлическая конструкция. Новыми материалами, разработанными для имплантации, являются сплавы с памятью формы на основе титана: Ti-Zr, Ti-Nb, Ti-Ni, которые способны имитировать сверхупругое механическое поведение костной ткани. Известен сплав Ti-18Zr-15Nb (ат. %), сочетающий улучшенную биосовместимость и уникальные механические характеристики с повышенным ресурсом обратной деформации. Однако при выборе метода формирования антибактериального покрытия на поверхности данного сплава следует избегать процессов, требующих повышенной температуры (выше 250 °C), поскольку это может существенно повлиять на его функциональные свойства вследствие выделения охрупчивающей ω -фазы.

Исходя из вышесказанного и анализа научной литературы была сформулирована цель работы:

Разработка низкотемпературного способа модификации поверхности для обеспечения антибактериальных свойств сверхупругого сплава Ti-18Zr-15Nb медицинского назначения.

Для достижения поставленной цели были решены следующие задачи:

1. Отработать методику предварительной обработки поверхности сплава в растворе «Пирании» и изучить влияние данной обработки на состав и структуру поверхности и приповерхностных слоев материала.
2. Разработать оптимальные параметры синтеза наночастиц серебра и золота на поверхности сверхупругого сплава Ti-18Zr-15Nb.
3. Изучить закономерности формирования наночастиц серебра и золота в среде синтеза, а также на поверхности сплава Ti-18Zr-15Nb после различной предварительной обработки: химического травления и атомно-слоевого осаждения.
4. Исследовать микроструктуру, химический состав и морфологию поверхности модифицированных материалов.
5. Исследовать антибактериальные свойства полученных материалов в отношении модельных грамотрицательных бактерий *E. Coli*.
6. Изучить биосовместимость и цитотоксичность модифицированных материалов в отношении клеток костной ткани - фибробластов.
7. Оценить влияние оптимального способа повышения антибактериальных свойств сплава на его механические свойства, в частности, сверхупругое поведение.

Научная новизна работы заключается в получении следующих новых результатов:

1. Установлено, что химическое травление сплава Ti-18Zr-15Nb в растворе «Пирании» приводит к формированию пористого слоя на поверхности толщиной около 100 нм. Формирование наночастиц серебра размером 3–30 нм и золота размером 1–40 нм на подложке из сплава с пористым слоем приводит к встраиванию частиц в пористый слой на глубину от 60 до 80 нм.
2. Выраженные антибактериальные свойства поверхности сплава, модифицированной в ходе предварительного химического травления и синтеза наночастиц серебра, достигаются за счет совместного эффекта: пористая поверхность материала обеспечивает более продолжительный ее контакт с бактериальными клетками, повышая эффективность воздействия наночастиц серебра.
3. Метод атомно-слоевого осаждения позволяет формировать на поверхности сплава Ti-18Zr-15Nb слой TiO_2 толщиной менее 10 нм. Формирование на поверхности оксидного слоя достаточного для выраженного антибактериального эффекта, количества наночастиц серебра возможно путем предварительной функционализации поверхности раствором NaBH_4 .
4. Наночастицы золота, модифицированные аминокислотой и антибиотиком, размером около 5 нм обеспечивают поверхности сплава более высокие антибактериальные свойства по сравнению с более крупными частицами золота (около 40 нм).
5. Модификация поверхности сплава Ti-18Zr-15Nb не оказывает негативного воздействия на его характеристики сверхупругого поведения. Материал сохраняет высокую полную обратимую деформацию (около 4%), высокую сверхупругую обратимую деформацию (2,4%) и малую остаточную деформацию (~0,1%).

Практическая значимость

1. Разработан способ формирования тонкого пористого слоя на поверхности сплава Ti-18Zr-15Nb. Разработана методика синтеза антибактериальных наночастиц серебра, при которой частицы формируются не только на поверхности, но и встраиваются в пористую структуру. Этот подход позволяет достичь высоких антибактериальных свойств поверхности при малой величине выхода ионов серебра (0,0370 мг/л).
2. Показано, что метод атомно-слоевого осаждения позволяет получить на поверхности тонкую однокомпонентную оксидную пленку TiO_2 вместо многокомпонентного естественного оксида, включающего все компоненты сплава.

3. Предложен способ предварительной функционализации гладкого оксидного слоя на поверхности сплава Ti-18Zr-15Nb, позволяющего формировать на ней достаточное количество наночастиц серебра для обеспечения выраженного антибактериального эффекта
4. Разработан комплексный способ модификации поверхности сплава наночастицами золота и лекарственными препаратами. Показана эффективность подхода последовательной модификации поверхности сплава (формирование пористого слоя – формирование наночастиц золота - функционализация промежуточным аминокислотным соединением (цистеином) - привязка антибиотика (гентамицина) для достижения высоких антибактериальных характеристик.
5. Продемонстрирована низкая цитотоксичность покрытий на основе наночастиц золота и лекарственных препаратов с периодом угнетения остеобластов не более 5 дней и быстрым восстановлением их активности в последующий период.
6. Разработанные методики повышения антибактериальных свойств сплава не снижают его функциональных механических свойств и могут быть применены для изделий различной формы.
7. Показана применимость разработанных подходов к другим металлическим материалам для биомедицинского применения, в частности, для никелида титана.
8. Разработан способ получения антибактериального покрытия на поверхности сплавов на основе титана медицинского назначения, зарегистрированный в виде патента РФ №2799364, дата регистрации 05.07.2023.

Положения, выносимые на защиту

1. Установлены режимы предварительной обработки поверхности сплава Ti-18Zr-15Nb травлением в растворе «Пирани», позволяющей добиться равномерной пористой структуры поверхности.
2. Установлены особенности формирования наночастиц серебра на поверхности сплава Ti-18Zr-15Nb, описаны их структура, химическое состояние поверхности, а также антибактериальные свойства.
3. Установлены особенности формирования наночастиц золота на поверхности сплава Ti-18Zr-15Nb, а также их дополнительной функционализации лекарственными веществами, приводящие в совокупности к проявлению устойчивого антибактериального эффекта.
4. Установлены особенности формирования слоя диоксида титана (в модификации анатаз) на поверхности сплава Ti-18Zr-15Nb, модифицированного наночастицами серебра, приводящие к повышению биосовместимости и антибактериального эффекта.

Личный вклад автора

Автор провел аналитический обзор литературы по теме исследования, принимал участие в подготовке образцов, проведении основной части экспериментальных исследований, анализе и обработке полученных результатов и подготовке научных статей.

Степень достоверности полученных результатов подтверждается отсутствием противоречий полученных результатов с отечественными и зарубежными литературными источниками, обусловлена всесторонним подходом к решению поставленных задач и использованием современного оборудования.

Апробация работы

Основные результаты работы были представлены на следующих научных конференциях:

1. Открытая школа-конференция стран СНГ «Ультрамелкозернистые и наноструктурные материалы – 2020», Уфа, Россия
2. Шестой междисциплинарный научный форум с международным участием. «Новые материалы и перспективные технологии- 2020», Москва, Россия
3. Международный симпозиум «Перспективные материалы и технологии», 2021, Минск, Беларусь.
4. IV Международная конференция «Сплавы с памятью формы», 2021, Москва, Россия.
5. 18 Российская ежегодная конференция молодых научных сотрудников и аспирантов «Физико-химия и технология неорганических материалов», 2021, Москва, Россия.
6. Бернштейновские чтения по термомеханической обработке металлических материалов, 2022, Москва, России

Публикации

Основные результаты работы отражены в 11 печатных работах, включая 4 статьи, входящих в международные базы данных «Web of Science» и «Scopus», 1 патент РФ.

Структура и объем работы

Диссертационная работа включает в себя 113 страниц машинописного текста, который состоит из введения, 3 глав, 8 выводов, 44 рисунков, 13 таблиц и библиографический список из 190 источников.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Глава 1 АНАЛИТИЧЕСКИЙ ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

В аналитическом обзоре литературы рассмотрены основные материалы, применяемые для замены костной ткани в настоящее время. Приведены требования, применяемые к данным материалам. Особое внимание уделено безникелевым титановым сплавам с памятью формы на основе Ti-Nb и Ti-Zr. Рассмотрены известные методы функционализации поверхности, для придания антибактериальных свойств, а также механизмы их действия. Особое внимание уделено формированию наночастиц благородных металлов для придания материалу имплантата антибактериальных свойств. Рассмотрены антибактериальные механизмы действия наночастиц серебра (AgNPs), а также механизмы действия наночастиц золота (AuNPs), как самостоятельно, так и в совокупности с лекарственными веществами.

В результате обзора литературы для антибактериальной модификации поверхности был выбран сплав Ti-18Zr-15Nb и предложены варианты формирования на его поверхности наночастиц золота и серебра. На основании изученной литературы была сформулирована цель работы и поставлены необходимые для ее достижения задачи.

Глава 2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДИКИ ИССЛЕДОВАНИЯ

В качестве объекта исследования был выбран сверхупругий сплав Ti-18Zr-15Nb (ат. %). Сплав был выплавлен в вакуумно-дуговой печи с нерасходуемым вольфрамовым электродом. Для исследований были использованы цилиндрические образцы диаметром 10 мм и высотой 2 мм. Поверхность образцов была предварительно подготовлена с использованием шлифовки на абразивной бумаге с увеличением зернистости от 320 до 4000 Р и полировки с применением алмазной суспензии (1мкм) на полировальной ткани. Далее все образцы были промыты в ультразвуковой ванне, заполненной изопропиловым спиртом. Часть образцов была обработана в течение 90 минут в растворе «Пирани» (98 % H_2SO_4 и 30 % H_2O_2 в соотношении 3:1) при комнатной температуре. После обработки в растворе «Пирани» образцы были промыты в дистиллированной воде в течение 15 минут и обработаны изопропиловым спиртом перед нанесением покрытий.

Оптимальные параметры предварительной обработки сплава в агрессивной среде раствора «Пирани» были установлены путем травления образца сплава Ti-18Zr-15Nb, а также образцов его основных компонентов – титана (Ti), циркония (Zr) и ниобия (Nb) различные промежутки времени, а именно – 90, 100 и 110 минут.

Отработка метода синтеза наночастиц серебра была проведена при помощи сравнительного анализа двух полиольных сред и варьирования времени синтеза. Этиленгликоль (ЭГ) и полиэтиленгликоль (ПЭГ) были выбраны в качестве сред. Синтез был проведен в течение 1 и 10 минут с добавлением AgNO_3 в количестве 100 мг, растворенного в 5 мл дистиллированной воды, в среду. Отработка параметров синтеза наночастиц золота была проведена путем изменения количества NaBH_4 в среде: к 32 мл H_2O было добавлено 1,5 мг $\text{HAuCl}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ и NaBH_4 в различных концентрациях ($46,8 \cdot 10^{-3}$ мг/мл; $23,4 \cdot 10^{-3}$ мг/мл; $11,7 \cdot 10^{-3}$ мг/мл; $4,6 \cdot 10^{-3}$ мг/мл). Осаждение тонких пленок диоксида титана TiO_2 было проведено методом атомно-слоевого осаждения (АСО) с использованием термостатного реактора низкого давления. Для роста пленки TiO_2 был применен этоксид титана $\text{Ti}(\text{OC}_2\text{H}_5)_4$ при температуре 150°C и вода (H_2O) при температуре 22°C . Каждый цикл реакции был осуществлен в следующем порядке: импульс этоксида титана (0,1 с), импульс продувки (4,0 с), импульс воды (0,2 с) и импульс продувки (4,0 с). Данный цикл был реализован 300 раз.

AgNPs были сформированы на поверхности сплава Ti-18Zr-15Nb методом полиольного синтеза. Ёмкость для синтеза, содержащую ПЭГ-400 (50 мл), размещали на магнитной мешалке. Далее образец погружали в среду синтеза и добавляли в нее свежеприготовленный раствор нитрата серебра (100 мг AgNO_3 в 5 мл H_2O). Данная система была помещена в шкаф с ультрафиолетовым (УФ) излучением на 8 минут, после чего синтез

был проведен еще в течение 10 минут без УФ-излучения. По окончании синтеза образцы были извлечены и промыты в ультразвуковой ванне в дистиллированной воде 15 минут и высушены на воздухе.

AgNPs были сформированы на поверхности сплава Ti-18Zr-15Nb, после предварительного формирования TiO_2 на поверхности, методом химического восстановления AgNO_3 с использованием NaBH_4 в качестве восстановителя по двум режимам синтеза. Для первого режима раствор NaBH_4 (концентрация 0,076 мг/мл) был охлажден до 1°C , затем 10 мл раствора AgNO_3 (0,255 мг/мл) было добавлено в среду по каплям в течение 10 минут. Был получен ярко-желтый цвет раствора, который указывал на образование коллоидных наночастиц Ag. Образец был погружен в полученный раствор на 12 ч при постоянном перемешивании. После этого образец был промыт в дистиллированной воде и высушен на воздухе. Для второго режима синтеза капля раствора NaBH_4 (2 мг/мл) была помещена на поверхность образца до полного высыхания. Затем образец был погружен в 50 мл раствора AgNO_3 (1 мг/мл) на 20 минут, промыт дистиллированной водой и высушен на воздухе.

AuNPs были сформированы на поверхности сплава Ti-18Zr-15Nb методом химического восстановления $\text{HAuCl}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ с использованием NaBH_4 в качестве восстановителя. Образцы были погружены в 32 мл H_2O , затем 1,5 мг $\text{HAuCl}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ и 0,25 мл NaBH_4 (1,5 мг/мл) было добавлено в среду синтеза. Часть образцов была предварительно функционализирована в растворе NaBH_4 (1,5 мг/мл) в течение 3 мин под воздействием ультразвуковой обработки, после чего были полностью погружены в раствор, состоящий из 32 мл H_2O и 1,5 мг $\text{HAuCl}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$. Синтез был проведен в течение 20 минут при постоянном перемешивании, далее все образцы были промыты в дистиллированной воде и высушены на воздухе. Часть образцов была выдержана в водном растворе цистеина ($\text{C}_3\text{H}_7\text{NO}_2\text{S}$, концентрация 1 мг/мл) в течение 24 часов. Затем N-гидроксисукцинимид (1,6 мг/мл) и EDC (2,4 мг/мл) были растворены в воде и образцы были погружены в данный раствор на 15 минут. Далее образцы были промыты и погружены в 1 мл раствора гентамицина (40 мг/мл) с добавлением 1 мл буферного раствора ($\text{pH} = 7,4$).

Образцы для механических испытаний с длиной от 50 до 80 мм и сечением $1,5 \times 2 \text{ мм}^2$ были подвергнуты холодной прокатке со степенью деформации 30% и последеформационному отжигу при температуре 550°C в течение 30 мин в атмосфере аргона с последующей закалкой в воду.

Исследование кинетики образования наночастиц в различных средах было проведено спектрофотометрическим методом на спектрофотометре UV-VIS-NIR «Cary-5000» фирмы Varian, с использованием программного обеспечения Ocean Optics.

Изучение микроструктуры поверхности образцов было проведено методом сканирующей электронной микроскопии на установке «7600F» JEOL, оснащенной энергодисперсионным микроанализатором (ЭДС, Oxford Instruments). Изучение размера образовавшихся AuNPs, а также изучение структуры покрытия TiO_2 было проведено методом просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ) и энергодисперсионной рентгеновской спектроскопии (ЭДС) на просвечивающем электронном микроскопе Tescan Osiris 200 кВ (FEI). Обработка изображений была проведена с использованием программного обеспечения Digital Micrograph (Gatan Inc.).

Изучение химического состояния поверхности после формирования наночастиц было проведено методом рентгеновской фотоэлектронной спектроскопии (РФЭС) на рентгеновском фотоэлектронном спектрометре PHI5500VersaProbeII. Для расшифровки спектров было использовано программное обеспечение CasaXPS. Спектры были откалиброваны с использованием $\text{C}1s$ - 285,0 эВ и аппроксимированы с использованием базовой линии Shirley. Для снятия концентрационных профилей по глубине поверхности образцов было применено травление ионами аргона (Ar^+) с ускоряющим напряжением 1-2 кВ и скоростью травления 1,8-5,6 нм/мин. Площадь распыления составляла $2 \times 2 \text{ мм}^2$.

Распыление проводили до полного удаления оксидного слоя с поверхности и достижения металлической подложки сплава.

Исследования механических характеристик материала проводили на установке INSTRON 5966. В ходе проведения механических испытаний на растяжение образцы растягивали до величины деформации 0,5%, после снимали нагрузку до достижения нулевых значений напряжения и повторяли цикл с увеличением деформации на 0,5% в каждом цикле, до разрушения образца.

Выход ионов серебра был измерен с помощью атомно-эмиссионного спектрометра ICP iCAP 6300. Для этого образцы погружали в 50 мл дистиллированной воды и выдерживали в течение 24 ч на лабораторном шейкере.

Антибактериальные свойства AgNPs были оценены с помощью анализа ингибирования роста клеток в отношении грамотрицательных бактерий *Escherichia coli* (E.coli, дикие). В качестве контрольных образцов использовались полированные диски Ti-18Zr-15Nb. Для этого 50 мкл среды Лурия-Бертани (LB: дрожжевой экстракт, триптон, NaCl), содержащей бактерии в концентрации 400 клеток/мл, было нанесено на тестируемые образцы и затем инкубировано в чашке Петри при 37°C в течение 24 часов. Чтобы предотвратить испарение LB-среды, по периметру чашки Петри было налито небольшое количество дистиллированной воды. Через 24 ч была собрана аликвота в количестве 50 мкл исходной LB-среды с клетками и затем разбавлена до 10^{10} раз. Далее по 15 мкл каждой бактериальной дисперсии было равномерно распределено по чашкам с агаром и инкубировано при 37°C в течение 24 ч. Количество колониеобразующих единиц КОЕ (ед/мл) было посчитано с помощью программного обеспечения ImageJ.

Антибактериальные свойства AuNPs были оценены с помощью анализа ингибирования роста клеток в отношении грамотрицательных бактерий *Escherichia coli* (E.coli, дикие). В качестве контрольных образцов использовались полированные диски Ti-18Zr-15Nb. Образцы были помещены в 24-луночный планшет, заполненный водой для поддержания влажности, и на поверхность образца было добавлено 100 мкл суспензии E.coli в бульоне LB (приблизительно 1×10^2 КОЕ/образец), затем систему инкубировали в аэробных условиях при 37°C в течение 24 ч. После инкубации суспензия бактерий с каждого образца была собрана и помещена на твердую пластину в чашке Петри. Затем планшеты были инкубированы в анаэробных условиях при температуре 37°C в течение 24 ч. Число колониеобразующих единиц КОЕ (ед/мл) было посчитано с помощью программного обеспечения ImageJ. Концентрация бактерий в данных образцах была также определена спектрофотометрически на основе калибровочных кривых E. coli. Для измерения оптической плотности (ОП) суспензия бактерий после инкубации на металлических образцах была помещена в 96-луночный планшет, и ОП была измерена при $\lambda = 600$ нм. Колонии были оценены по 3 контрольным точкам для каждого из режимов синтеза.

Оценка цитотоксичности образцов, модифицированных AuNPs была проведена при помощи клеточной культуры мышинных остеобластоподобных клеток MC3T3. Клетки культивировали в среде DMEM/F12 (Gibco, Thermo Fisher Scientific) с содержанием 5% CO₂ при температуре 37°C. Затем в среду было добавлено 10% термоинактивированной фетальной бычьей сыворотки (FBS, PAA), 100 ед/мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина. Стандартное количество остеобластов (5×10^3 клеток/см) было высеяно на поверхность модифицированных образцов, которые далее были помещены в 24-луночные планшеты для культивирования клеток. Клетки были зафиксированы через 1, 3, 5 и 7 дней 3,7% формальдегидом и окрашены 4',6-диамидин-2'-фенилиндолдигидрохлоридом (DAPI) (Sigma). Количество клеточных культур было определено с помощью микроскопа Axioplan (Zeiss), оснащенного объективом $\times 40$. Для определения площади одиночных клеток и расположения активного цитоскелета было проведено окрашивание клеток Alexa488-фаллоидином и моноклональным паксиллиновым антителом (клон 349, лаборатория трансдукции BD).

Для установления возможности применения отработанных методик синтеза на других материалах был использован сплав TiNi (50,8 ат. %Ni) в исходном состоянии (контрольная обработка – отжиг при 700°C в течение 30 минут с закалкой в воде) и после старения (дополнительный отжиг при 430 °C в течение 60 минут с закалкой в воде). Поверхность материала была подвергнута травлению в растворе «Пирании» в течение 90 минут. Синтез НЧ был проведен по следующим, ранее разработанным режимам: AgNPs – образец был опущен в 50 мл ПЭГ-400 и добавлено 100 мг AgNO₃ (в 5 мл H₂O), синтез был проведен в течение 8 минут с УФ воздействием и 10 минут без УФ воздействия; AuNPs – образец был опущен в 32 мл H₂O, добавлено 1,5 мг HAuCl₄*4H₂O и 0,25 мл NaBH₄ (1,5мг/мл), синтез был проведен в течение 20 минут.

Глава 3 РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ОБСУЖДЕНИЕ

Исследование влияния времени травления на микроструктуру поверхности

На рисунке 1 приведены изображения микроструктуры образцов после травления в растворе «Пирании» в разные промежутки времени.

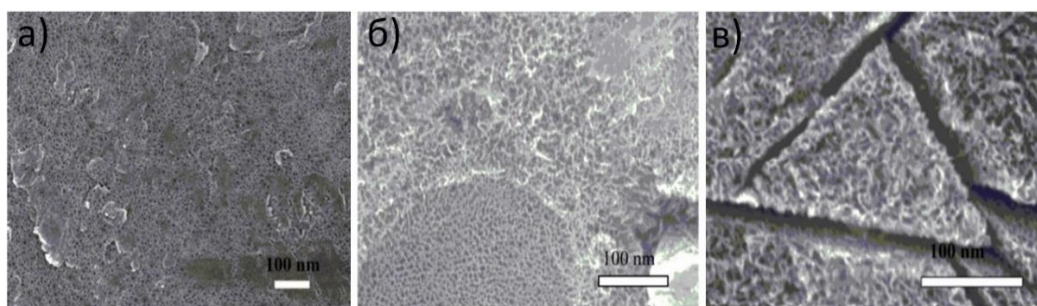


Рисунок 1 – Микроструктура поверхности образца Ti-18Zr-15Nb после травления: а) 90 минут; б) 100 минут; в) 110 минут

Травление в течение 90 минут (рисунок 1а) обеспечивает формирование на поверхности равномерной пористой структуры, в отличие от поверхности образцов, которые были подвержены травлению в течение 100 и 110 минут и имеют более разнородную микроструктуру. На рисунке 1б после 100 минут выдержки в растворе «Пирании» наблюдается губчатая структура, поры менее равномерны, а поверхность более развита. На рисунке 1в микроструктура образцов еще более разнородна, хорошо различимы границы раздела. Результаты СЭМ позволили установить, что на поверхности сплава после обработки в среде «Пирании» в течение 90 минут формируется равномерная пористая структура (рисунок 2а). Средний размер пор составил порядка 8 нм (рисунок 2б).

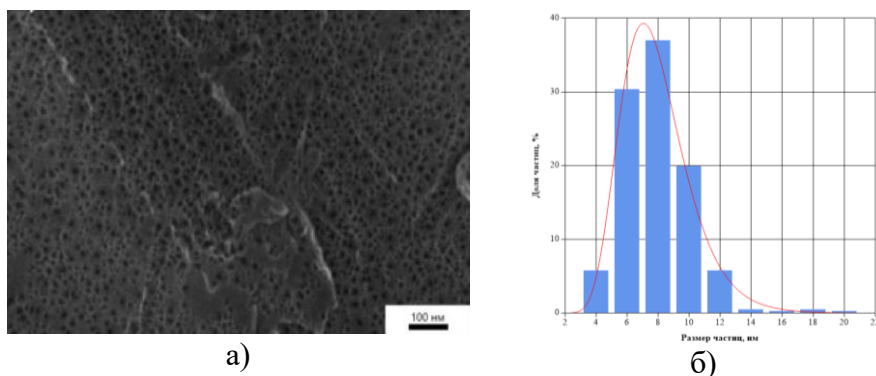


Рисунок 2 – Микроструктура образца Ti-18Zr-15Nb после обработки 90 минут в растворе «Пирании»; б) гистограмма распределения пор по размерам

Было установлено, что для предварительной обработки образцов в растворе «Пираньи» оптимальным временем травления является 90 минут. При данном времени обработки на поверхности можно отметить равномерную пористую структуру. Данное время было выбрано для дальнейших исследований.

Исследование формирования наночастиц серебра на поверхности сплава Ti-18Zr-15Nb

Для подбора оптимальных параметров синтеза AgNPs на поверхности была проведена серия экспериментов с использованием различных сред: этиленгликоля и полиэтиленгликоля, с временем синтеза 1 и 10 минут для каждого образца. Спектрофотометрический анализ позволил установить особенности формирования наночастиц серебра. На рисунке 3 представлены, полученные UV-VIS-спектры.

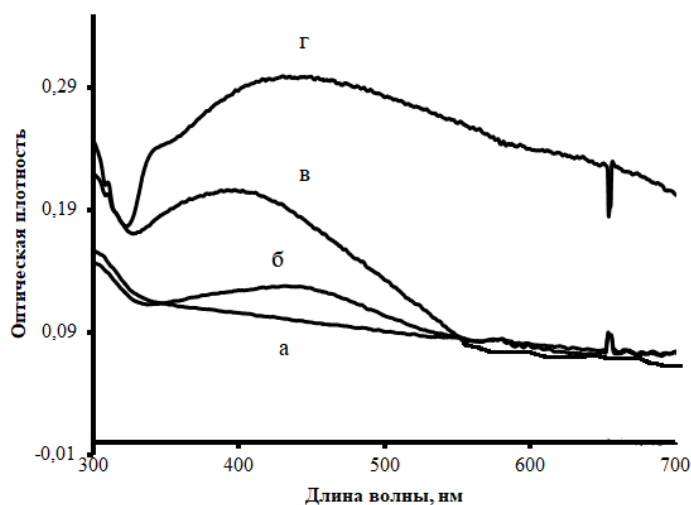


Рисунок 3 – UV-VIS-спектры исследуемых образцов: а) ЭГ/1 минута; б) ЭГ/10 минут; в) ПЭГ-400/1 минута; г) ПЭГ-400/10 минут

Установлено, что при использовании в качестве среды синтеза этиленгликоля (время синтеза 1 минута) в исследуемом диапазоне волн отсутствует пик поглощения, что свидетельствует о недостаточном восстановлении AgNPs и малой эффективности восстановителя. Однако, при времени синтеза 10 минут ярко выраженный пик наблюдается на длине волны 450 нм, а положение пика говорит о формировании частиц с большими размерами. Данные результаты позволяют сделать вывод о том, что стабилизирующий эффект ЭГ является недостаточным.

При использовании ПЭГ-400 в качестве среды синтеза достаточно выраженный пик наблюдается уже после 1 минуты синтеза и расположен на длине волны 415 нм, соответствующей меньшим размерам наночастиц. При 10 минутах синтеза пик смещается в сторону больших значений длин волн, но тем не менее, не превосходящих значения длины волны при синтезе в среде ЭГ. Такая особенность свидетельствует о высокой восстановительной и стабилизирующей способности ПЭГ-400.

На рисунке 4 представлены электронные изображения образцов, полученных для каждого из режимов синтеза.

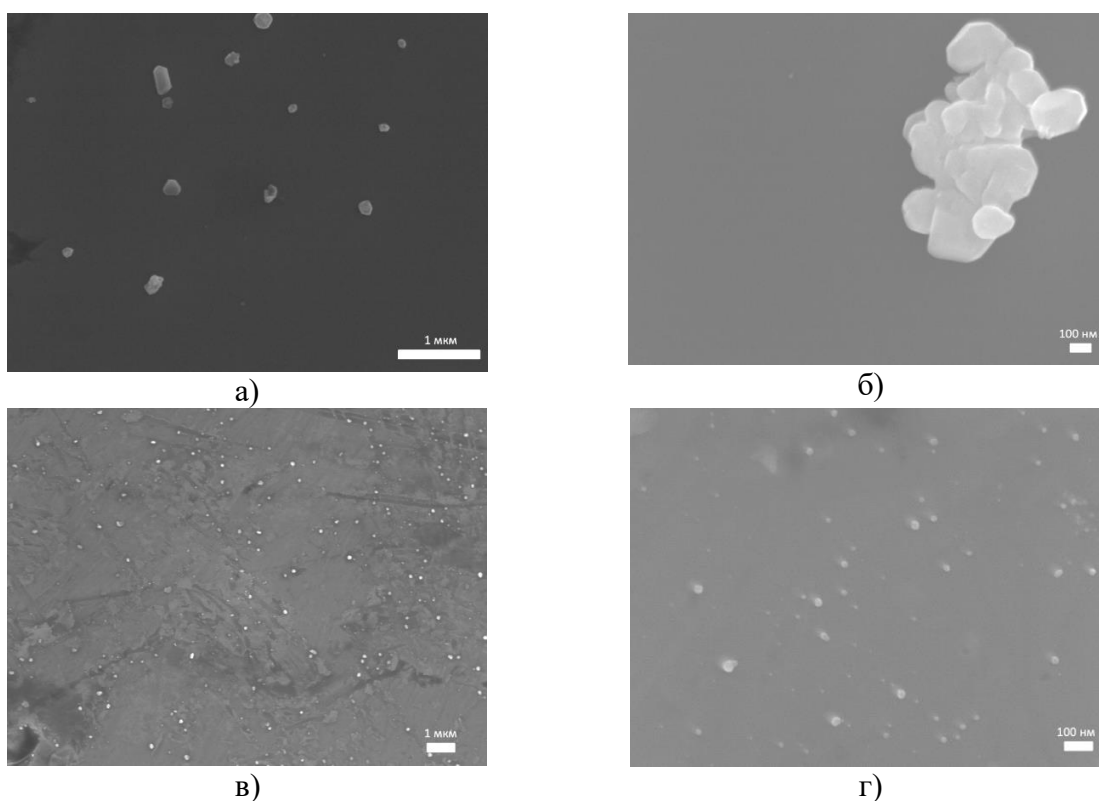


Рисунок 4 – Микроструктура поверхности образцов: а) ЭГ/1 минута; б) ЭГ/10 минут; в) ПЭГ-400/1 минута; г) ПЭГ-400/10 минут

В результате синтеза при каждом из режимов наночастицы серебра были сформированы на поверхности сплава Ti-18Zr-15Nb. Наночастицы после формирования в среде ПЭГ-400 равномерно распределены по поверхности и их размер не превышает 100 нм. После формирования наночастиц в ЭГ на поверхности можно наблюдать агломераты крупных AgNPs. Исходя из вышесказанного, средой синтеза для формирования AgNPs на подложке был выбран ПЭГ-400, обладающий более выраженными стабилизирующими свойствами и наночастицы серебра были сформированы на поверхности по режиму, описанному в методике: 50 мл ПЭГ-400+100 мг AgNO_3 в 5 мл H_2O (10 минут УФ+8 минут). При этом AgNPs были сформированы на двух типах поверхностей – полированной и пористой (обработанной в растворе «Пираньи»), образцы обозначены Ag/Ti и Ag/Ti(т) соответственно.

На рисунке 5а представлена микроструктура поверхности образца Ag/Ti. Размер наночастиц на такой поверхности составил от 5 до 30 нм, средний размер - 18 ± 2 нм. Установлено, что покрытие поверхности наночастицами однородное. На поверхности образца Ag/Ti(т) (рисунок 5б) сформированы наночастицы серебра размером 3–30 нм (средний размер 13 ± 2 нм).

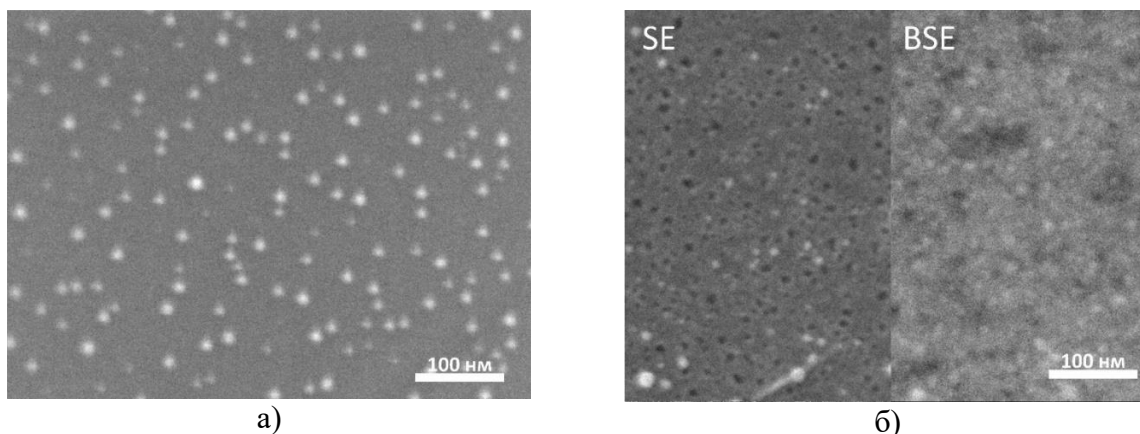


Рисунок 5 – а) микроструктура поверхности образца Ag/Ti; б) микроструктура поверхности образца Ag/Ti(t)

По СЭМ изображениям в обратно-отраженных электронах (рисунок 5б) был сделан вывод о том, что AgNPs сформированы не только на поверхности, но и внутри пор. Анализ химического состава поверхности позволил сделать вывод о содержании AgNPs. Установлено, что содержание серебра на поверхности, предварительно обработанной в растворе «Пирании» значительно больше, чем на поверхности без предварительной обработки, и составляет 0,1 ат.% и 0,7 ат.% соответственно, что подтверждает формирование AgNPs в порах после травления, а также указывает на то, что развитая поверхность более склонна к формированию на ней наночастиц серебра.

Методом рентгеновской фотоэлектронной спектроскопии было изучено химическое состояние поверхности сплава. Для образцов, после формирования наночастиц серебра на поверхности присутствуют пики, расположенные при энергии 368,1 – 368,3 эВ и 374,1 – 374,3 эВ, которые соответствуют металлическому серебру (Ag 3d 5/2 и Ag 3d 3/2). Значение спин-орбитального расщепления энергии 6,0 эВ между Ag 3d 5/2 и Ag 3d 3/2 характерно для Ag⁰. Содержание серебра на поверхности образца Ag/Ti составляет 2,1 %, на поверхности образца Ag/Ti(t) – 7,6 %. Результаты исследования методом РФЭС подтверждают данные ЭДС анализа: более развитая структура поверхности способствует образованию большего количества наночастиц серебра.

Для оценки глубины залегания наночастиц было проведено травление поверхности ионами аргона и получены концентрационные профили распределения Ag по глубине для каждого образца (рисунок 6). Для поверхности Ag/Ti травление приводит к быстрому удалению серебра с поверхности (рисунок 6а). Сигнал Ag на профиле для образца Ag/Ti(t) уменьшается постепенно, достигая нуля на глубине 60 нм (рисунок 6б). Данный результат позволяет сделать вывод о том, что AgNPs формируются в пористом слое образца. После более длительного травления ионами аргона изменения основных компонентов сплава и кислорода малы, соответственно достигнута подложка сплава. Данные результаты позволяют оценить толщину оксидного слоя как 10 – 12 нм для образца Ag/Ti и толщину пористого слоя как 100 нм для образца Ag/Ti(t).

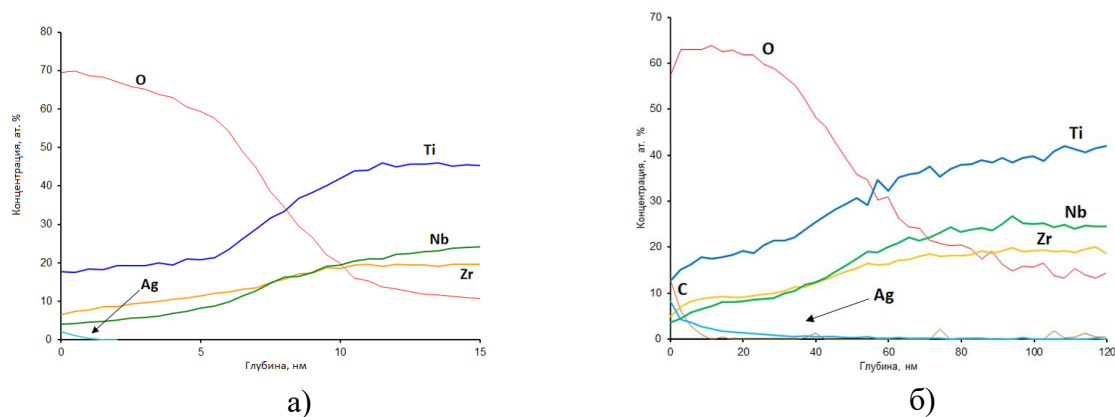


Рисунок 6 – Концентрационные профили распределения Ag и основных компонентов сплава по глубине для: а) образца Ag/Ti; б) образца Ag/Ti(t)

Спектры РФЭС основных компонентов сплава позволили установить, что Ti, Zr и Nb находятся на поверхности в форме своих высших оксидов. Спектр Ti2p для всех проанализированных образцов имеет два основных пика при 458,6–458,8 и 464,4–464,5 эВ ($\Delta E=5,8$), что характерно для TiO_2 . Спектр Zr3d имеет пики на энергиях связи 182,4–182,6 и 184,8–185,0 эВ ($\Delta E=2,4$ эВ), что соответствует ZrO_2 . Спектр Nb3d имеет сигнал на энергиях связи 207,2–207,6 и 210,0–210,3 эВ ($\Delta E=2,8$), что соответствует Nb_2O_5 . Также установлено, что степени окисления основных компонентов не меняются после обработки сплава в агрессивной среде «Пираньи», однако по мере увеличения глубины анализа во время профилирования сигналы Ti2p, Zr3d и Nb3d смещаются в сторону более низких значений энергии связи, указывая на то, что в глубине пористого слоя возрастает доля субоксидов.

Вышеизложенные результаты позволяют дать оценку структуре поверхности сплава, которая схематично представлена на рисунке 7.

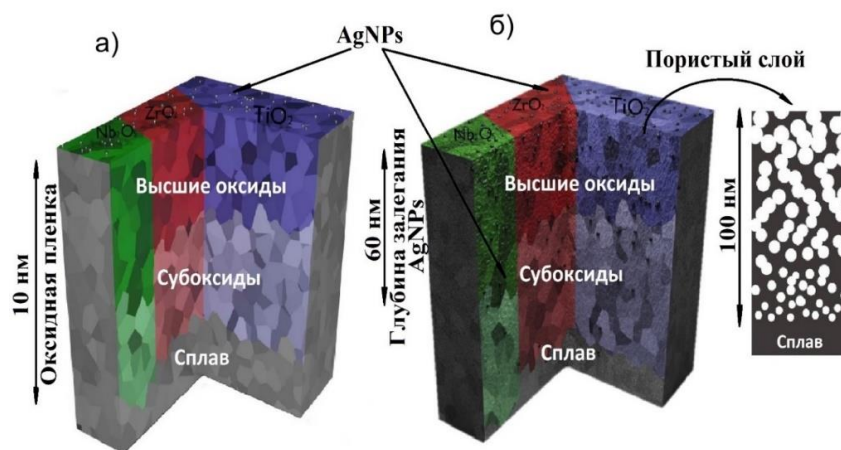


Рисунок 7 – Схема структуры поверхности сплава а) образец Ag/Ti; б) образец Ag/Ti(t)

Результаты антибактериальных испытаний по отношению к бактериальным клеткам E.Coli представлены на рисунке 8. Установлено, что образцы с пористой поверхностью, модифицированные наночастицами серебра, обладают антибактериальными свойствами. Рост бактерий полностью подавлен, в отличие от остальных образцов. На гладкой поверхности, модифицированной наночастицами серебра был установлен слабовыраженный антибактериальный эффект. На рисунке 8 (б-д) приведены СЭМ-изображения образцов после проведения антибактериальных испытаний. Видно, что в случае образца Ag/Ti(t) на поверхности отсутствуют клетки бактерий, что подтверждает высокую эффективность метода антибактериальной модификации. В случае остальных

образцов поверхность плотно покрыта клетками *E.coli*. Основным механизмом антибактериального эффекта серебра является выход ионов Ag с поверхности, однако пористая поверхность также способна механически повреждать внешнюю оболочку клетки, что дополнительно повышает антибактериальные характеристики материала. Помимо этого, такая поверхность способна обеспечить более плотный и продолжительный контакт бактерий с AgNPs и, следовательно, повысить эффективность воздействия его ионов. Из представленных данных видно, что более высокая концентрация клеток наблюдается в случае образца, после предварительного травления, без наночастиц, что подтверждает, эффективность пористого слоя для задержания клеток на поверхности.

После выдержки в дистиллированной воде в течение 24 ч концентрации ионов Ag были определены как 0,0114 мг/л для образца Ag/Ti и 0,0370 мг/л для образца Ag/Ti(т). Наблюдаемая трехкратная разница хорошо объясняет различную бактериальную активность образцов, содержащих AgNPs.

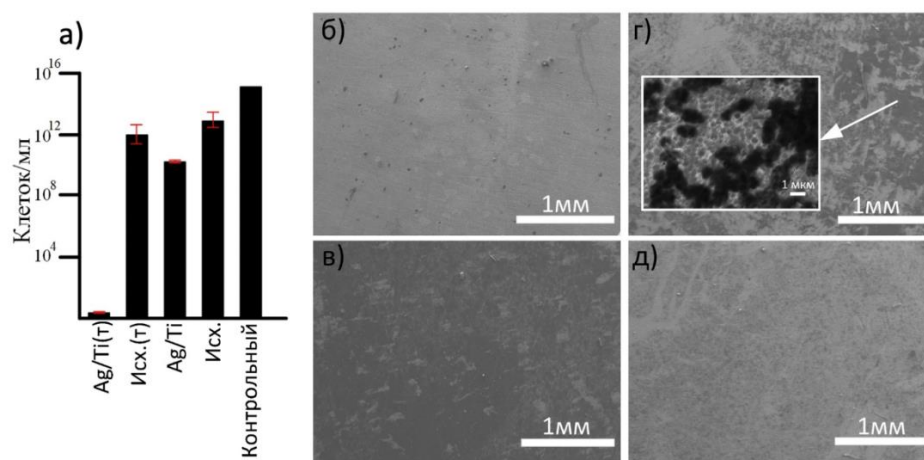


Рисунок 8 – а) антибактериальная активность исследованных образцов против культуры *E.coli*; микрофотографии поверхности исследованных образцов после антибактериальных испытаний б) Ag/Ti(т), в) Ag/Ti, г) исходный после травления, д) исходный полированный

Исследование формирования наночастиц серебра на поверхности сплава Ti-18Zr-15Nb после атомно-слоевого осаждения TiO_2

На рисунке 9 представлено ПЭМ-изображение высокого разрешения, на котором наблюдается покрытие АСО толщиной 10 нм. Соответствующие карты распределения элементов показывают, что этот слой обогащен кислородом и содержит значительное количество титана. Следует отметить, что в данном слое полностью отсутствует Zr и Nb, указывая, что образовавшийся оксидный слой состоит исключительно из оксида Ti.

На профиле распределения элементов (рисунок 9б) видно, что концентрации Ti и O быстро возрастают в области поверхности, что связано с появлением покрытия TiO_2 АСО. Можно заметить первоначальное снижение концентрации титана, при перемещении по профилю от основы сплава к покрытию. Содержание кислорода медленно увеличивается, в то время как концентрация Nb и Zr сначала остается неизменной, а потом уменьшается практически до нуля. Можно предположить, что эта тонкая область толщиной примерно 4-6 нм представляет собой естественную оксидную пленку сплава, содержащую все его компоненты. Ближе к поверхности концентрации Ti и O быстро возрастают, что связано с появлением покрытия TiO_2 АСО.

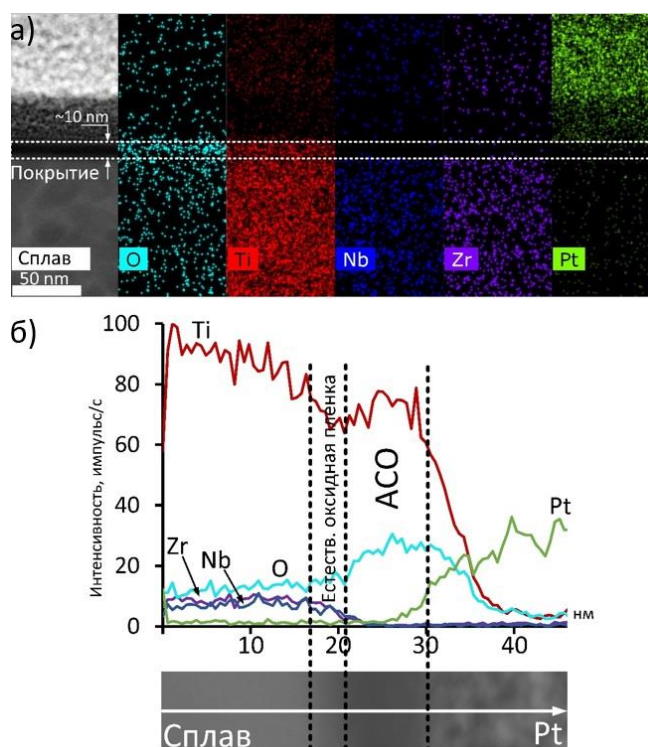


Рисунок 9 – Структура поперечного сечения покрытия TiO₂ ACO: а) СПЭМ-изображение и соответствующие карты распределения элементов; б) профиль распределения элементов и соответствующее СПЭМ изображение

На рисунке 10 представлена атомная структура покрытия TiO₂. Изображения ПЭМ высокого разрешения позволяют различать упорядоченные и аморфизированные участки в структуре сплава. Фурье-преобразования показывают отражения исходной β -фазы (110) с межплоскостным расстоянием 0,239 нм и металлической Pt (111) и (200) с межплоскостным расстоянием 0,227 нм и 0,197 нм соответственно (платина была нанесена в качестве защитного слоя покрытия при подготовке ламели). АСО покрытие представлено по большей части аморфной структурой, содержащей, однако, упорядоченные области с характерным межплоскостным расстоянием 0,34 нм, что соответствует характерному межплоскостному расстоянию TiO₂ в модификации анатаза с $d=0,352$ нм. Стоит отметить, что в сплаве на границе с покрытием АСО наблюдается α -фаза с межплоскостным расстоянием (100) 0,256 нм. Повышенное содержание кислорода в приповерхностном слое стабилизирует α -фазу и способствует превращению $\beta \rightarrow \alpha$ в приповерхностной области во время процесса атомно-слоевого осаждения.

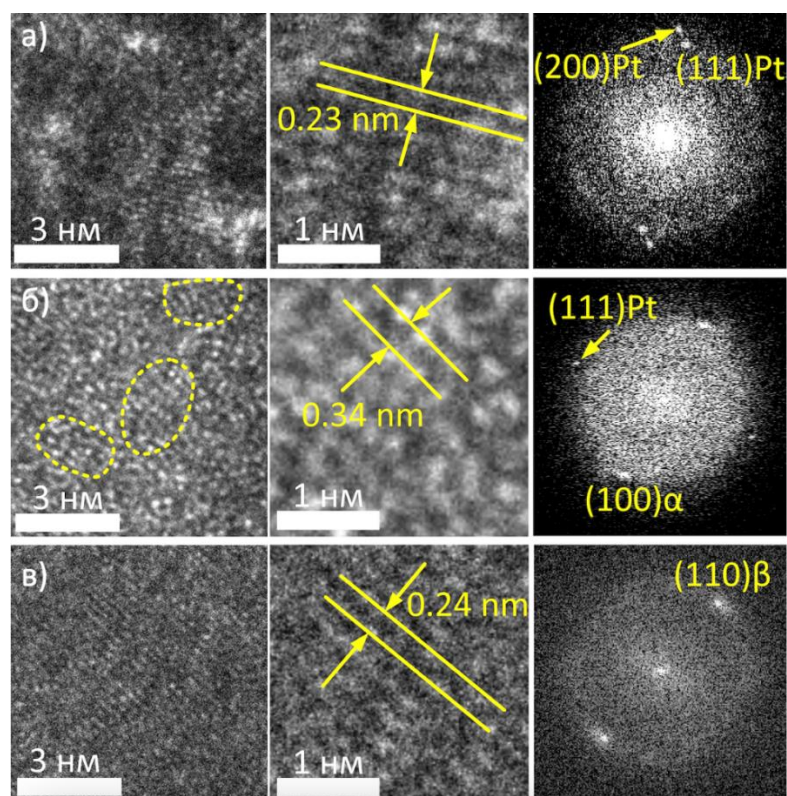


Рисунок 10 – ПЭМ изображения высокого разрешения и соответствующие Фурье-преобразования: а) защитного слоя платины; б) слоя АСО; в) подложки сплава

На рисунке 11 приведены результаты сканирующей электронной микроскопии образцов после формирования AgNPs по двум режимам: NaBH_4 (концентрация 0,076 мг/мл) при температуре 1°C + 10 мл раствора AgNO_3 (0,255 мг/мл), полученные образцы обозначены как Ag/АСО и предварительная функционализация NaBH_4 (2 мг/мл) + 50 мл раствора AgNO_3 (1 мг/мл), полученные образцы обозначены как Ag/АСО(ф). Видно, что поверхность образца Ag/АСО покрыта относительно редкими наночастицами серебра. Разброс их размерных характеристик достаточно велик и варьируется от нескольких нанометров до субмикронных масштабов. Большинство наночастиц Ag имеют размеры 40–60 нм. ЭДС-анализ позволил установить, что концентрация серебра на поверхности составляет порядка 0,2 ат. %. Можно предположить, что коллоидные AgNPs обладают слабым сродством к покрытию TiO_2 , сформированному методом атомно-слоевого осаждения. Напротив, для образца Ag/АСО(ф) установлено наличие значительного количества субмикронных AgNPs, равномерно распределенных по покрытию TiO_2 , большинство наночастиц имеют размеры около 20 нм. Концентрация серебра на поверхности увеличивается и достигает 0,6 ат. %.

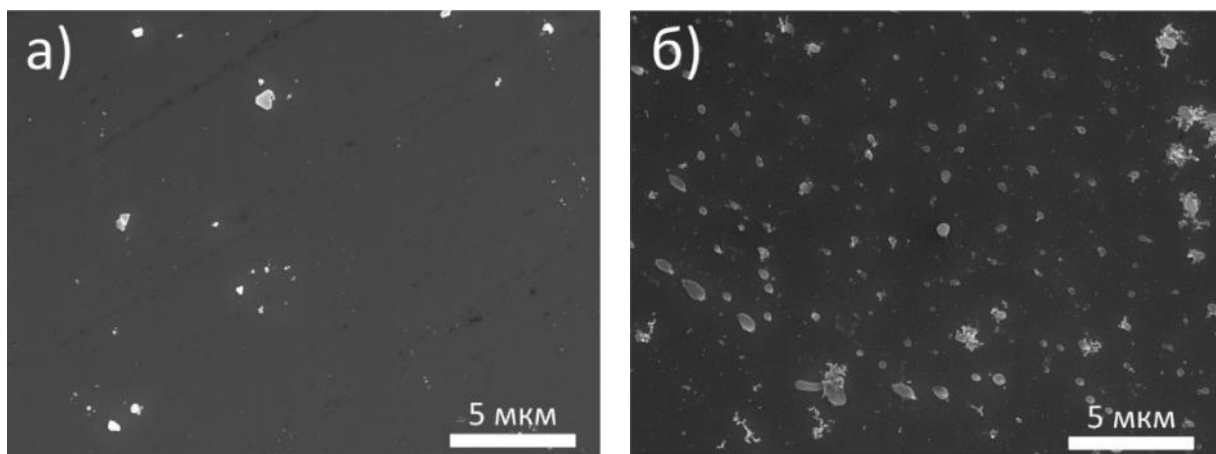


Рисунок 11 – СЭМ-изображения модифицированной поверхности образца
а) Ag/ACO и б) Ag/ACO(φ)

Оценка химического состояния поверхности была проведена методом рентгеновской фотоэлектронной спектроскопии (рисунок 12). Спектры кислорода (O1s) представлены тремя компонентами: связи O-Ti, расположенная при 529,8 эВ (ACO) и 530,1 эВ (Ag/ACO(φ)), поверхностные гидроксильные группы — $532,0 \pm 0,2$ эВ и небольшое количество связей O-C — $534,0 \pm 0,2$ эВ. Спектр Ti2p разложен на два компонента: Ti2p 3/2, расположенный на 464,2 эВ для ACO и 464,6 эВ для Ag/ACO(φ) и Ti2p1/2 на энергии 458,5 эВ для ACO и 458,9 эВ для Ag/ACO(φ). Величина спин-орбитального расщепления ΔE для этих компонентов равна 5,7 эВ, что характерно для оксида титана (IV). Для образца с наночастицами серебра на поверхности наблюдается сдвиг спектра Ti2p на 0,4 эВ в направлении более высоких энергий, что может быть связано с переносом заряда от оксида к AgNPs. Дублет Ag3d демонстрирует два пика: Ag3d 5/2 и 3/2, расположенных при 374,0 эВ и 368,0 эВ и соответствует Ag^0 , подтверждая металлическое состояние Ag на поверхности значением ΔE , равным 6,0 эВ.

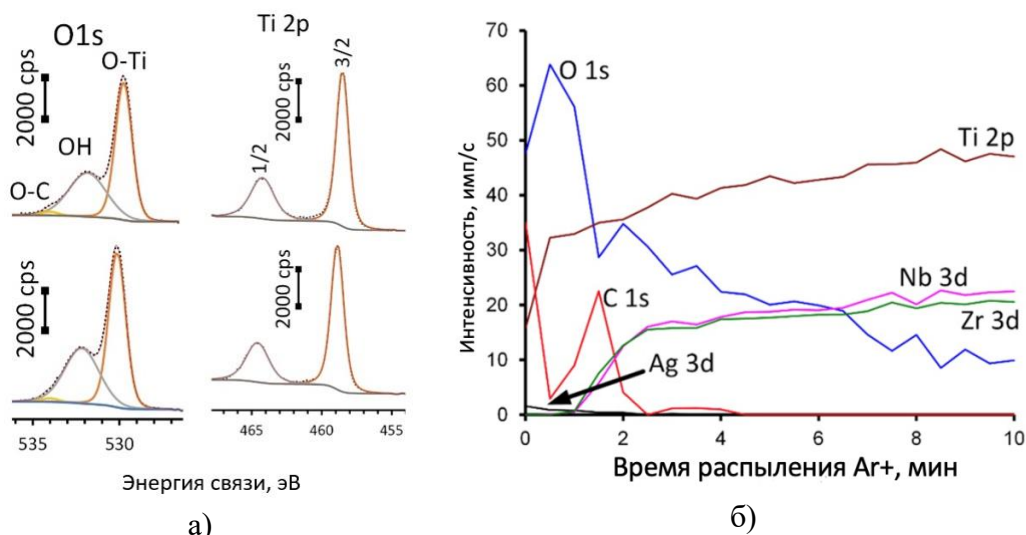


Рисунок 12 – РФЭС-спектры а) Ti2p и O1s; б) концентрационный профиль распределения элементов по глубине для образца Ag/ACO(φ)

Для оценки глубины залегания наночастиц серебра было проведено травление поверхности ионами аргона. Установлено, что верхний слой образца состоит из оксида титана, что указывает на успешное формирование покрытия ACO на поверхности сплава. Естественный оксидный слой содержит все основные компоненты сплава. Поверхность

образца Ag/АСО менее обогащена наночастицами серебра, по сравнению с поверхностью Ag/АСО(ф). После 10 минут травления ионами Ag^+ сформированное покрытие удаляется и достигается основа сплава. Профиль распределения элементов по глубине для образца Ag/АСО(ф) показан на рисунке 12б. Содержание кислорода быстро снижается в течение первых 1,5 мин травления (удаляется приблизительно 13 нм поверхностного слоя), что указывает на удаление АСО покрытия с поверхности, в то время как интенсивность сигналов Nb и Zr возрастает. Сигнал Ag снижается в ходе ионного травления и полностью удаляется с поверхности через 2 минуты травления ионами Ag^+ . Установлено, что AgNPs не встраиваются в покрытие АСО, а расположены исключительно на его поверхности.

Результаты антибактериальных испытаний всех образцов представлены на рисунке 13.

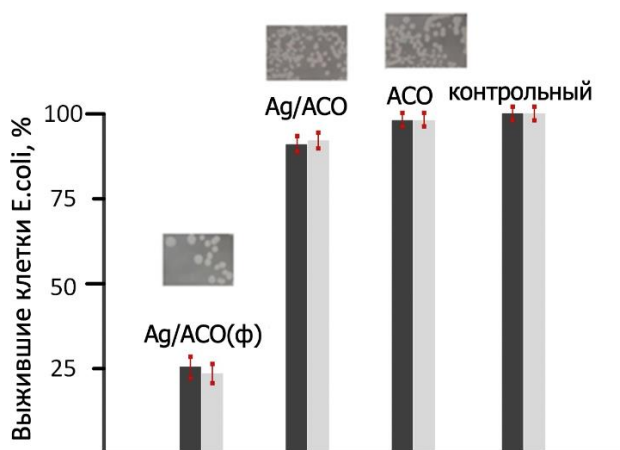


Рисунок 13 – Результаты антибактериальных тестов исследованных образцов

Как видно из приведенных данных, образец Ag/АСО(ф) проявляет наиболее высокие антибактериальные свойства, демонстрируя подавление роста бактериальных клеток E.coli более чем на 75%. Образец Ag/АСО демонстрирует гораздо менее выраженный эффект при подавлении роста клеток всего на 10%, а образец АСО показывает практически те же результаты, что и контрольный. Можно сделать вывод, что антибактериальный эффект исследуемых материалов обусловлен исключительно присутствием на их поверхности наночастиц серебра.

Исследование формирования наночастиц золота на поверхности сплава Ti-18Zr-15Nb

На рисунке 14а представлены результаты спектрофотометрии коллоидных наночастиц золота, полученных при различных концентрациях NaBH_4 в среде синтеза. Установлено, что спектры поглощения, соответствующие растворам, при концентрациях NaBH_4 $46,8 \cdot 10^{-3}$ мг/мл и $23,4 \cdot 10^{-3}$ мг/мл, обладают достаточно широкими пиками на длине волны 530 и 528 нм соответственно, что указывает на образование AuNPs относительно больших размеров. Растворы светло и темно-фиолетового цвета также указывают на образование агломератов AuNPs. Для раствора, полученного при концентрации NaBH_4 $4,6 \cdot 10^{-3}$ мг/мл (светло-оранжевого цвета), можно наблюдать выраженный пик при 522 нм. Это указывает на более низкую скорость восстановления AuNPs из-за снижения содержания NaBH_4 в среде. Довольно узкий пик, соответствующий ярко-оранжевому раствору, полученному при концентрации $11,7 \cdot 10^{-3}$ мг/мл NaBH_4 , расположен на длине волны 517 нм, что указывает на образование достаточного количества мелкодисперсных наночастиц золота со средним размером 5 нм.

По результатам ПЭМ высокого разрешения установлено, что наночастицы золота находятся в металлическом состоянии (рисунок 14б). Межплоскостное расстояние $d = 2,35 \text{ \AA}$ для полученных частиц, соответствует (111) Au. Стоит отметить, что все наблюдаемые частицы находятся в монокристаллическом состоянии. Средний размер сформированных наночастиц составляет 3 нм (рисунок 14в).

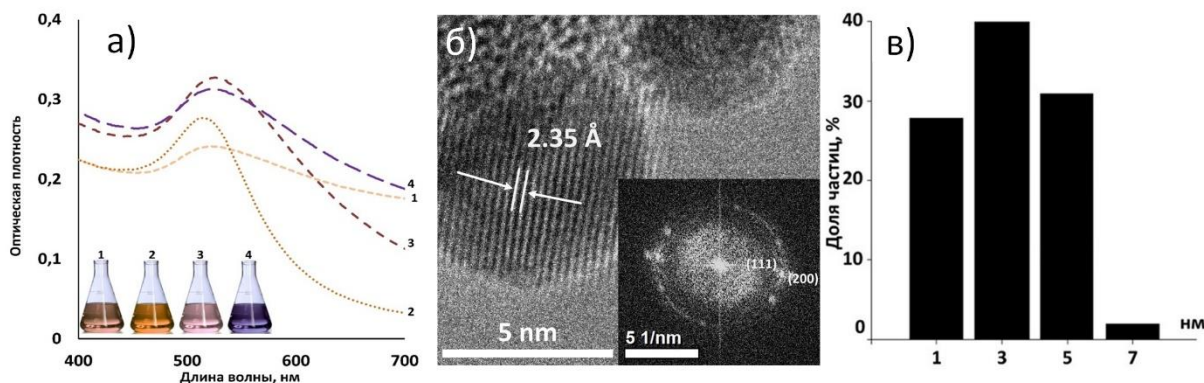


Рисунок 14 – а) Спектры наночастиц золота, полученные при различных концентрациях NaBH_4 в среде синтеза (1 - $46,8 \cdot 10^{-3} \text{ мг/мл}$; 2 - $23,4 \cdot 10^{-3} \text{ мг/мл}$; 3 - $11,7 \cdot 10^{-3} \text{ мг/мл}$; 4 - $4,6 \cdot 10^{-3} \text{ мг/мл}$); б) изображение AuNPs, полученное с помощью ПЭМ высокого разрешения, и соответствующее Фурье-преобразование; в) гистограмма распределения AuNPs по размерам

Вышеописанные результаты позволили сделать вывод об оптимальном режиме синтеза для формирования AuNPs на поверхности сплава Ti-18Zr-15Nb из коллоидного раствора. В качестве альтернативного способа синтеза проводили функционализацию поверхности 10 мл $\text{NaBH}_4(\text{УЗ})$ с последующим погружением в 32 мл $\text{H}_2\text{O} + 1,5 \text{ мг HAuCl}_4$. После этого часть образцов выдерживали в водном растворе $\text{C}_3\text{H}_7\text{NO}_2\text{S}$ (1 мг/мл) в течение 24 часов. Затем N-гидроксисукцинимид (1,6 мг/мл) и EDC (2,4 мг/мл) были растворены в воде и образцы были погружены в данный раствор на 15 минут, а далее образцы погружены в 1 мл раствора гентамицина (40 мг/мл) с добавлением 1 мл буферного раствора ($\text{pH} = 7,4$). Полученные образцы обозначены как Au/Ti, Au/Ti(ф), Au/Ti+цист., Au/Ti(ф)+цист., Au/Ti+A и Au/Ti(ф)+A соответственно.

На рисунке 15 представлены СЭМ-изображения поверхности образцов Au/Ti и Au/Ti(ф) после формирования наночастиц золота. Видно, что поверхность образца Au/Ti усеяна мелкими частицами. Их структура и распределение по размерам хорошо коррелируют с частицами, которые были получены в коллоидном растворе. СЭМ-изображение, полученное в режиме обратно отраженных электронов (рисунок 15в), демонстрирует несколько небольших агломератов наночастиц, а также многочисленные AuNPs, образовавшиеся в приповерхностном слое сплава, что указывает на то, что наночастицы золота образуются внутри пористого слоя из раствора. Согласно ЭДС-анализу, концентрация золота на поверхности не превышает 0,4 ат. %.

Для поверхности образца Au/Ti(ф) наблюдается отличная от предыдущей структура. Диапазон распределения AuNPs по размерам имеет верхнюю границу 100 нм (рисунок 15г-е). Агломераты наночастиц плотно усеивают поверхность сплава. ЭДС-анализ показывает, что концентрация золота значительно возрастает, достигая 18,2 ат. %. Такое резкое различие в структуре поверхности и содержании AuNPs объясняется методом синтеза. Предварительная функционализация подложки в растворе NaBH_4 приводит к тому, что формирование золота происходит преимущественно в приповерхностном слое образца.

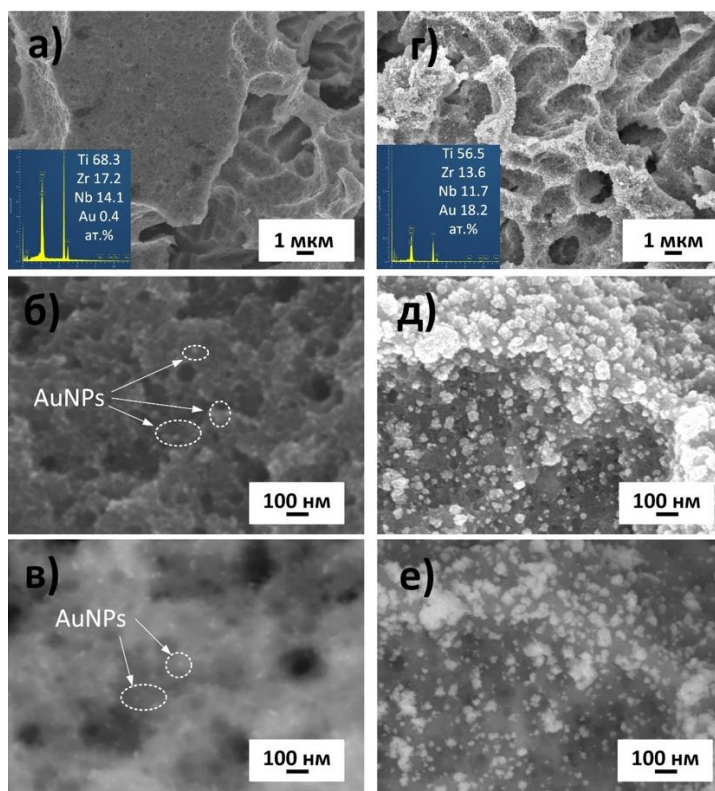


Рисунок 15 – СЭМ-изображения поверхности образца Au/Ti а,б) во вторичных электронах; в) в обратно отраженных электронах и поверхности образца Au/Ti(ф) г,д) во вторичных электронах; е) в обратно отраженных электронах и соответствующие ЭДС-спектры

На рисунке 16 представлено поперечное сечение приповерхностного слоя образца Au/Ti(ф). Установлено, что толщина пористого слоя составляет около 100–120 нм. AuNPs могут образовываться как на поверхности, так и глубоко (до 80 нм) в подповерхностном пористом слое.

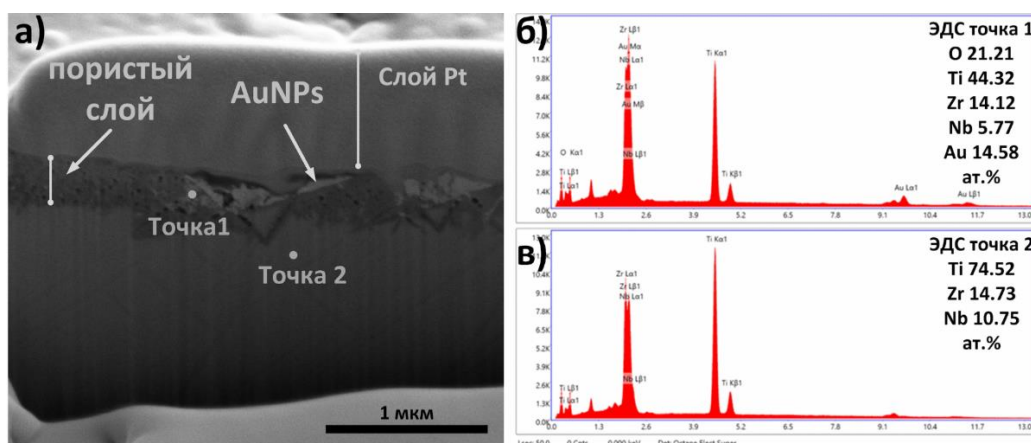


Рисунок 16 – а) поперечное сечение приповерхностного слоя образца Au/Ti(ф); б,в) ЭДС спектры соответствующих областей

Исследования методом рентгеновской фотоэлектронной спектроскопии позволили установить, что основные компоненты сплава находятся на поверхности в виде их высших оксидов: TiO_2 , ZrO_2 , Nb_2O_5 . Об этом свидетельствуют сигналы $\text{Ti}2p$ (458,4-458,8 и 464,2-464,6 эВ при спин-орбитальном расщеплении $\Delta E=6,0$ эВ), $\text{Zr}3d$ (182,4-182,5 и 184,8-184,9 эВ при спин-орбитальном расщеплении $\Delta E=2,5$ эВ) и $\text{Nb}3d$ (207,2-207,3 и 210,0-210,1 со

спин-орбитальным расщеплением $\Delta E=2,8$ эВ) (рисунок 17). Установлено, что химическое состояние основных компонентов сплава не изменяется при модификации образцов аминокислотой, а также после функционализации гентамицином. Интенсивности сигналов основных компонентов сплава для образца Au/Ti заметно выше, чем для образца Au/Ti(ф) из-за различных концентраций наночастиц на поверхности. Это связано с тем, что в Au/Ti(ф) большее количество золота на поверхности частично перекрывает сигнал от основных компонентов, поскольку глубина анализа РФЭС составляет всего несколько нм.

Пики РФЭС, расположенные при 83,3–83,6 эВ и 86,9–87,2 эВ, соответствуют Au4f_{7/2} и Au4f_{5/2} (рисунок 17). Небольшой сдвиг в сторону более высоких значений энергии может быть связан с эффектом зарядки или незначительным окислением поверхности. Тем не менее, в обоих образцах золото находится в металлическом состоянии, о чем свидетельствует спин-орбитальное расщепление в 3,6 эВ дублетов Au4f. Следует отметить, что интенсивность сигнала для Au4f в образце Au/Ti(ф) намного выше, чем в образце Au/Ti, что подтверждает наличие большего количества AuNPs на поверхности. Интенсивность РФЭС-спектров Au4f заметно снижается после привязки цистеина, а далее гентамицина.

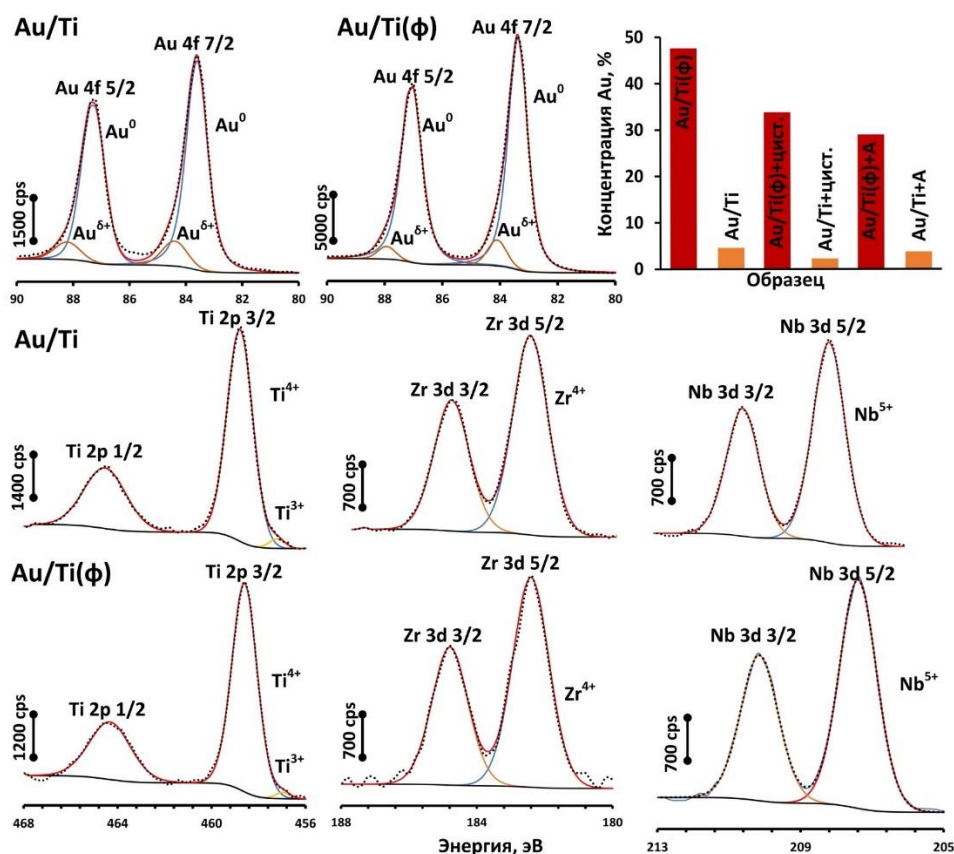


Рисунок 17 – РФЭС-спектры Au 4f, Ti 2p, Zr 3d и Nb 3d для образцов Au/Ti и Au/Ti(ф), концентрация Au на каждом этапе функционализации поверхности

Анализ спектров S2p (рисунок 18) подтверждает присутствие цистеина на поверхности, поскольку данное соединение содержит тиольную группу. Пики при значениях 161,1 и 162,4 эВ для (Au/Ti) и 160,6 и 161,8 (Au/Ti(ф)) относятся к сульфидам металлов S₂⁻ на поверхности образца. Пики, расположенные на энергиях 168,8–169,0 и 168,8–170,0 эВ связаны с сульфатами металлов SO₄²⁻, а значения энергий 166,7–167,0 и 167,8–168,2 эВ соответствуют SO₃²⁻ сульфитам. Присутствие данных компонентов серы на поверхности вызвано предварительным травлением поверхности сплава раствором «Пираньи», содержащим серную кислоту. Компоненты при значениях 161,4–162,0 и 162,6–163,1 эВ демонстрируют связь между серой и золотом. Эти сигналы также наблюдаются в

спектрах образцов, обработанных в растворе цистеина. Успешная функционализация поверхности L-цистеином отчетливо видна по новым высокоинтенсивным пикам при 163,8–163,9 (Au/Ti+цистеин) и 165,0–165,1 эВ (Au/Ti(ф)+цистеин). На рисунке 19 видно, что пик цистеина гораздо более выражен в случае образца Au/Ti по сравнению с образцом Au/Ti(ф). Можно предположить, что AuNPs меньшего размера больше подходят для функционализации L-цистеином. РФЭС-спектры N1s исследуемых образцов позволяют установить наличие связи цистеин-гентамицин. После привязки гентамицина содержание азота увеличивается с 0,7% до 1,8% (Au/Ti+A) и с 1,4% до 2,3% (Au/Ti/(ф)+A) соответственно.

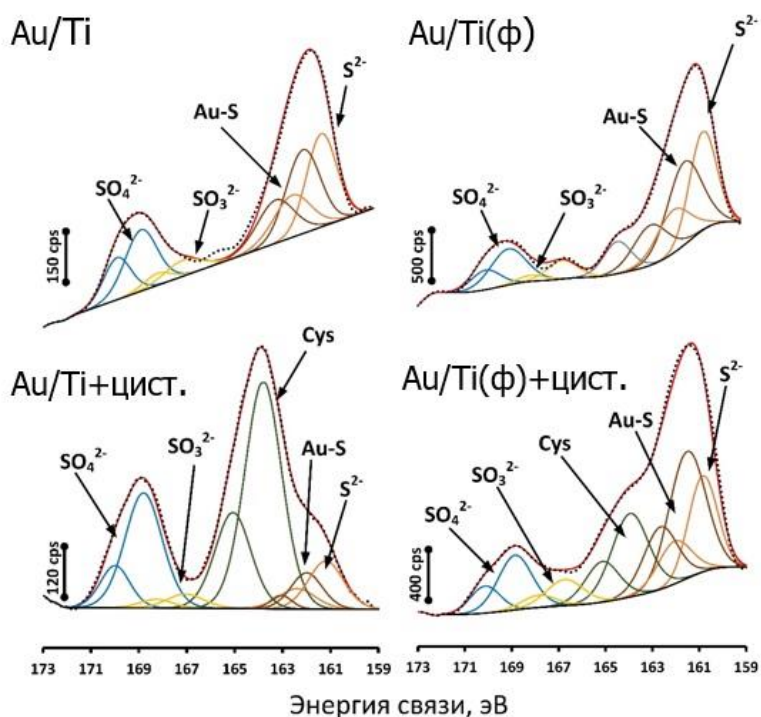


Рисунок 18 – РФЭС-спектры S2p исследованных образцов

Были установлены основные характеристики сверхупругого поведения образца после модификации поверхности, а также исходного образца сплава Ti-18Zr-15Nb, такие как упругая обратимая деформация (ϵ_r^{el}), сверхупругая обратимая деформация (ϵ_r^{SE}), остаточная деформация (ϵ_r^f) и полная обратимая деформация (ϵ_r^{tot}) (рисунок 19). По диаграммам деформации-разгрузки установлено, что количество циклов до разрушения составляет 15 циклов для образца Au/Ti и 13 циклов для образца Ti-18Zr-15Nb соответственно. Значения полной обратимой деформации показали близкие значения, порядка 4%. Значения остаточной деформации находятся в пределах 0,1%, при деформации до 4%, а далее увеличиваются, указывая на менее совершенное сверхупругое поведение для данных материалов, что связано с увеличением вклада пластической деформации и накоплением дефектов кристаллической решетки. Сверхупругая обратимая деформация для обоих образцов составляет ~2,4%, что характерно для сплава Ti-18Zr-15Nb. Значения сверхупругой деформации значительно возрастают, с увеличением числа циклов в то время, как упругая деформация имеет почти линейную зависимость. Таким образом деформация протекает преимущественно по сверхупругому механизму с самого начала испытаний, показывая типичное для данного материала сверхупругое поведение. Можно сделать вывод, что применяемый метод модификации поверхности не влияет на сверхупругие характеристики и механические свойства материала.

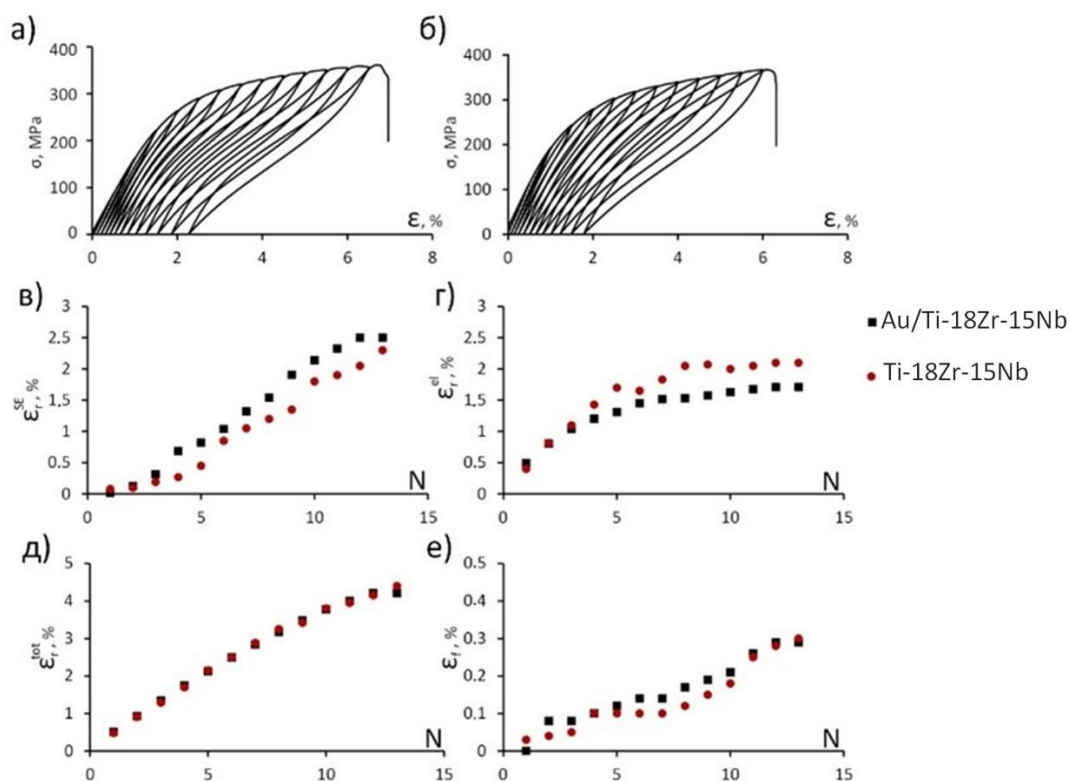


Рисунок 19 - Диаграммы деформации-разгрузки для а) исходного образца сплава Ti-18Zr-15Nb и б) модифицированного образца Au/Ti; в) сверхупругая обратимая деформация (ϵ_r^{SE}); г) упругая обратимая деформация (ϵ_r^{el}); д) полная обратимая деформация (ϵ_r^{tot}); е) остаточная деформация (ϵ_r^f)

Результаты антибактериальных тестов с использованием штаммов бактерий E.coli показаны на рисунке 20.

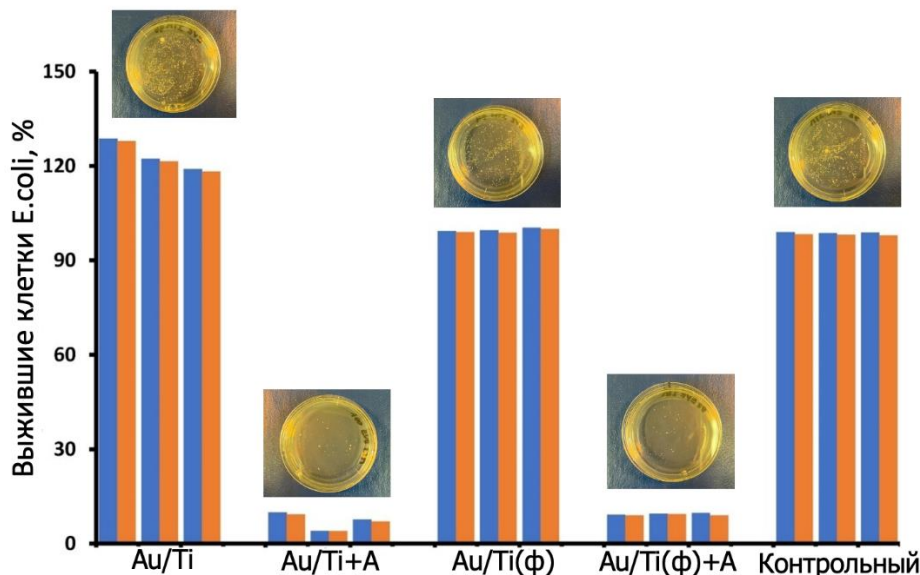


Рисунок 20 – Результаты антибактериальных тестов с использованием штаммов бактерий E.coli исследованных образцов

Оба образца без антибактериальной модификации поверхности лекарственными веществами (Au/Ti и Au/Ti(ф)) не демонстрируют антибактериальный эффект в отношении клеток E. coli. Кроме того, образец Au/Ti имеет более высокую концентрацию бактерий по сравнению с контрольным образцом. Это явление может быть связано с тем фактом, что

пористый слой, появляющийся на поверхности образца после травления, более благоприятен для роста бактерий по сравнению с полированной поверхностью контрольного образца.

Образцы после загрузки гентамицином обладают выраженным антибактериальным эффектом, который обусловлен действием антибиотика. Подавление роста бактерий составляет около 79% для Au/Ti(ф)+A и до 90% для Au/Ti+A. Хотя в абсолютных значениях эти результаты близки, следует отметить, что в случае образца Au/Ti+A этот результат достигается при значительно более низкой концентрации AuNPs, что подчеркивает их повышенную эффективность. Известно, что комплекс цистеин-гентамицин остается связан с AuNPs и не высвобождается в раствор, предотвращая рост бактериальных клеток на поверхности и повышая устойчивость поверхности к образованию биопленки. Принимая во внимание этот механизм, можно сделать вывод, что наночастицы золота меньшего размера в большей мере способствуют функционализации поверхности цистеин-гентамицином по сравнению с более крупными AuNPs.

Результаты пролиферации клеток на поверхности модифицированных образцов продемонстрировали снижение в течение первых 5 дней, что является следствием ингибирования введенных лекарственных веществ. После прекращения действия препарата пролиферация клеток значительно ускоряется и достигает результатов, полученных для контрольных образцов, не содержащих на поверхности AuNPs, связанные с лекарственными веществами. Поверхность образца Au/Ti+A с AuNPs меньших размеров, демонстрирует большее количество клеток, а также более высокую среднюю площадь клеток по сравнению с образцом Au/Ti(ф)+A, что в совокупности с результатами антибактериальных тестов свидетельствует о большей эффективности AuNPs меньших размеров.

Перенос отработанных методик синтеза на другие материалы

Предложенные в данной работе методики синтеза наночастиц для антибактериальной модификации поверхности являются высокоэффективными и могут быть реализованы для модификации других материалов для медицинских применений. Для демонстрации данного факта в данной работе был взят один из наиболее распространенных медицинских сплавов с памятью формы – никелид титана. Наночастицы серебра и золота были равномерно сформированы на поверхности материала (рисунок 21), что свидетельствует о возможности реализации данных методик на поверхности других медицинских материалов.

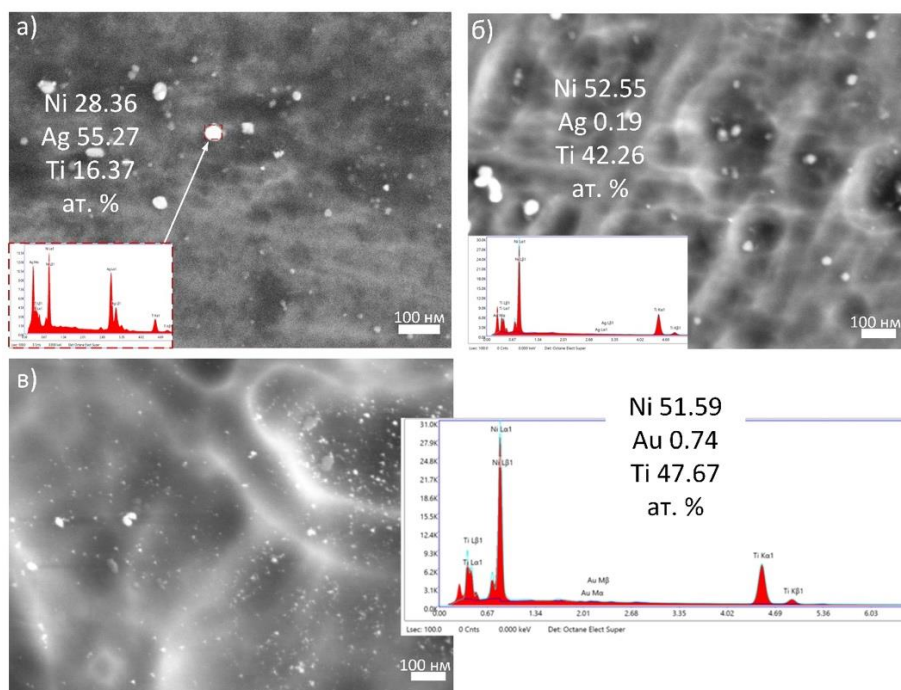


Рисунок 44 - Микроструктура поверхности образца TiNi после формирования а, б) AgNPs; в) AuNPs и соответствующие ЭДС-спектры

ВЫВОДЫ

1. Разработана методика формирования пористого слоя толщиной до 100 нм на поверхности сплава Ti-18Zr-15Nb, заключающаяся в травлении поверхности в растворе «Пирании» ($\text{H}_2\text{SO}_4 + \text{H}_2\text{O}_2$) в течение 90 минут.
2. Разработан метод синтеза наночастиц серебра, заключающийся в восстановлении нитрата серебра в среде полиола, обеспечивающий равномерное распределение наночастиц на поверхности сплава Ti-18Zr-15Nb. Средний размер AgNPs составляет 18 ± 2 нм для полированной поверхности и 13 ± 2 нм для поверхности, подвергнутой предварительному травлению в растворе «Пирании». Наночастицы серебра встраиваются в пористый слой на глубину около 60 нм.
3. При исследовании химического состава поверхности сплава Ti-18Zr-15Nb, модифицированного AgNPs, установлено, что пористая структура поверхности способствует формированию на ней большего количества наночастиц серебра по сравнению с полированной поверхностью сплава.
4. Разработан способ формирования наночастиц серебра на поверхности сплава Ti-18Zr-15Nb с покрытием TiO_2 , предварительно синтезированным методом атомно-слоевого осаждения для повышения биоактивных свойств поверхности. Способ позволяет сформировать на поверхности данного типа равномерно распределенные наночастицы серебра размером от 20 нм до 60 нм.
5. Установлено, что пористая поверхность сплава Ti-18Zr-15Nb, модифицированная наночастицами серебра, проявляет высокие антибактериальные свойства за счет более высокого выхода ионов серебра и длительного контакта с бактериальными клетками по сравнению с полированной поверхностью сплава Ti-18Zr-15Nb, модифицированной наночастицами серебра.
6. Разработан метод синтеза наночастиц золота, заключающийся в химическом восстановлении золотохлористоводородной кислоты (HAuCl_4) в водной среде,

обеспечивающий равномерное распределение этих наночастиц размером от 1 до 40 нм на пористой поверхности сплава Ti-18Zr-15Nb. Наночастицы золота встраиваются в пористый слой на глубину около 80 нм.

7. Показана эффективность привязки лекарственных препаратов к наночастицам золота на поверхности сплава Ti-18Zr-15Nb через промежуточное аминокислотное соединение для повышения антибактериальных свойств сплава. Показана низкая цитотоксичность поверхности сплава, декорированной наночастицами золота и лекарственными препаратами, в отношении клеточной костной ткани – остеобластов.
8. Установлено, что формирование пористого слоя на поверхности сплава не оказывает негативного влияния на характеристики его сверхупругого поведения. Разработанные методики модификации поверхности могут быть применены к другим сверхупругим сплавам медицинского назначения, в частности, к никелиду титана.

Основные результаты работы изложены в следующих публикациях:

1. Konopatsky, A. S., Teplyakova, T. O., Popova, D. V., Vlasova, K. Y., Prokoshkin, S. D., Shtansky, D. V. (2022). Surface modification and antibacterial properties of superelastic Ti-Zr-based alloys for medical application. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 209, 112183.
2. Konopatsky, A., Teplyakova, T., Sheremetyev, V., Yakimova, T., Boychenko, O., Kozik, M., Shtansky, D. V., Prokoshkin, S. (2023). Surface Modification of Biomedical Ti-18Zr-15Nb Alloy by Atomic Layer Deposition and Ag Nanoparticles Decoration. *Journal of Functional Biomaterials*, 14(5), 249.
3. Teplyakova T. O., Popova, D. V., Prokoshkin, S. D., Konopatsky, A. S. Silver nanoparticles formation over Ti-Zr-Nb alloy via polyol synthesis // *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*. – IOP Publishing, 2020. – Т. 1008. – №. 1. – С. 012040.
4. Barilyuk, D., Bazlov, A., Arkharova, N., Teplyakova, T., Konopatsky, A., Prokoshkin, S. (2022). Novel Zr-Rich Alloys of Ternary Ti-Zr-Nb System with Large Superelastic Recovery Strain. *Metals*, 12(2), 185.
5. Теплякова Т. О., Попова Д.В., Прокошкин С.Д., Конопацкий А.С. Полиольный синтез наночастиц серебра на поверхности сплава Ti-18Zr-15Nb медицинского назначения // *Ультрамелкозернистые и наноструктурные материалы*. – 2020. – С. 370-372.
6. Теплякова Т. О., Попова Д.В., Конопацкий А.С. Формирование наночастиц серебра на поверхности сверхупругого титанового сплава для медицинского назначения. Formation of silver nanoparticles on the surface of the superelastic titanium alloy for medical use // *Новые материалы и перспективные технологии*. – 2020. – С. 780
7. Теплякова Т. О., Попова Д.В., Власова К.Ю., Конопацкий А.С. Антибактериальный эффект поверхности сплава Ti-18Zr-15Nb для медицинского применения // *Международный симпозиум «Перспективные материалы и технологии»*. – 2021. – С. 224-226.
8. Теплякова Т. О., Попова Д.В., Власова К.Ю., Конопацкий А.С. Обеспечение антибактериального эффекта поверхности сверхупругого сплава Ti-18Zr-15Nb // *IV Международная конференция «Сплавы с памятью формы»*. – 2021. – С. 80.
9. Теплякова Т. О. Синтез наночастиц золота методом химического восстановления HAuCl_4 на поверхности сверхупругого сплава Ti-18Zr-15Nb // *18 Российская ежегодная конференция молодых научных сотрудников и аспирантов «Физико-химия и технология неорганических материалов»*. – 2021. – С. 283.

10. Теплякова Т. О., Конопацкий А.С., Прокошкин С.Д. Антибактериальная модификация поверхности сплава Ti-18Zr-15Nb наночастицами золота //Бернштейновские чтения по термомеханической обработке металлических материалов. – 2022. – С. 102–102.
11. Теплякова Т.О., Конопацкий А.С., Прокошкин С.Д. Способ получения антибактериального покрытия на поверхности сплавов на основе титана медицинского назначения. Заявка на патент РФ №2022131663 от 05.12.2020, опубликовано 05.07.2023 Бюл. №19, патент РФ №2799364, дата регистрации 05.07.2023.